

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

08. 9. 2004

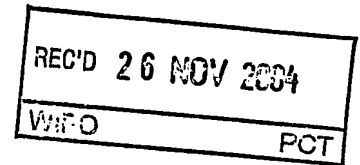
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 3 年 9 月 5 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 3 - 3 1 4 3 4 5
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 3 1 4 3 4 5]

出 願 人
Applicant(s): 久光製薬株式会社
千葉県

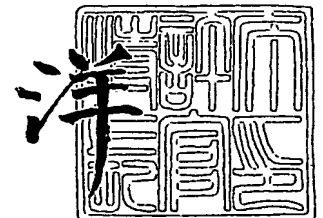


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 1 月 1 1 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 03-1449
【提出日】 平成15年 9月 5日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12Q 1/66
C12Q 1/68
A61K 37/00

【発明者】
【住所又は居所】 千葉県千葉市中央区仁戸名町 6 6 6 - 2 千葉県がんセンター内
【氏名】 中川原 章

【発明者】
【住所又は居所】 千葉県千葉市中央区仁戸名町 6 6 6 - 2 千葉県がんセンター内
【氏名】 尾崎 俊文

【特許出願人】
【識別番号】 000160522
【氏名又は名称】 久光製薬株式会社

【代理人】
【識別番号】 100088155
【弁理士】
【氏名又は名称】 長谷川 芳樹

【選任した代理人】
【識別番号】 100092657
【弁理士】
【氏名又は名称】 寺崎 史朗

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 014708
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

AICDとp53との相互作用における阻害剤。

【請求項 2】

阻害剤がAICDとp53と結合におけるアンタゴニストであることを特徴とする請求項 1 に記載の阻害剤。

【請求項 3】

阻害剤がc-Ablまたはp19^{ARF}であることを特徴とする請求項 1 に記載の阻害剤。

【請求項 4】

神経細胞において、候補薬剤がAICDとp53との相互作用における阻害剤であるか否かを決定することを特徴とする、アルツハイマー病の治療・予防において有用な薬剤をスクリーニングする方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】AICDとp53との相互作用における阻害剤

【技術分野】

【0001】

本発明は、AICDとp53との相互作用における阻害剤に関する。さらに詳しくは、AICDによるp53の安定化を阻害するタンパク質等の薬剤およびそのスクリーニング方法に関する。

【背景技術】

【0002】

高齢者における痴呆症の主なものであるアルツハイマー病（ADともいう）の病態の全容と真の発症原因は、未だ解明されておらず、その抜本的な予防・治療法も確率されていない。しかしながら、一方発症メカニズムについては、「アミロイド仮説」が提唱され、AD患者の病理学的所見および家族性アルツハイマー病の遺伝学的解析から、広く受け入れられることとなった（非特許文献1）。

【0003】

これは、ADの発症と進行に、アミロイドと呼ばれる一群のタンパク質の脳（大脳皮質）への異常蓄積が関与するという説である。簡単には、 β -APP（ β -amyloid precursor protein）と呼ばれる、1回膜貫通型タンパク質が細胞膜外側で β セクターゼによって切断を受け（ β カット）、引き続きその断片（N末端）が γ セクターゼによって切断を受け（ γ カット）、二種類の断片（ β -40および β -42）が産生される。これらの断片は、凝集性が高く、アミロイドを形成し、細胞外に老人斑として蓄積される。このようなアミロイドの産生、凝集、蓄積が神経細胞障害を引き起こし、神経細胞死に至らしめる。

【0004】

「アミロイド仮説」に基づいて、ADの治療法（治療剤）、予防法の開発が行われてきているが、それらは、 β セクターゼおよび γ セクターゼの阻害剤、並びに抗アミロイド抗体などである。しかしながら、ADは多因子性疾患であり、アミロイド仮説にのみに基づくドラッグデザインでは、AD治療法として十分ではないことも指摘されている。

【0005】

一方、 γ カットを受けた、 β -40および β -42のC末端側の断片である、C-60およびC-58については、それらの切断後の挙動およびADとの関わりについては、よく知られていなかった。最近、これらの断片C-60およびC-58（以下、集合的にAICDともいう）が核移行して、ヒストンアセチルトランスフェラーゼTip60（さらに核アダプター蛋白Fe65）と結合して、複合体を形成し、Gal4-Tip60による転写を活性化することが見出された（非特許文献2）。

【0006】

しかしながら、AICDとアルツハイマー病の発症との関連性については、依然として、未解明のままである。

【非特許文献1】富田泰輔ら、「アルツハイマー病」、細胞工学、2001年、第20巻、第11号、p. 1489-1494

【非特許文献2】Xinwei Caoら、「A Transcriptionally Active Complex of APP with Fe65 and Histone Acetyltransferase Tip60」, Science, July 6 2001, Vol 293, p. 115-120

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

AICDの細胞核内での挙動を調べて、アルツハイマー病の病因になり得る分子生物学的メカニズムを明らかにし、そのメカニズムにおいて、拮抗、阻害、誘導等の調節作用を呈する、分子はアルツハイマー病の治療・予防に有用となるであろう。したがって、そのような分子を見出すことは、新たなアルツハイマー病の治療・予防剤の開発につながる。

【0008】

本発明は、癌サプレッサー蛋白であるp53とAICDとの相互作用を遺伝子、蛋白レベルで解明することを目的の1つとする。さらに、本発明は、AICDとp53との相互作用における阻害剤を提供することを別の目的とする。くわえて、AICDとp53との相互作用における阻害剤のスクリーニング方法を提供することも目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、p53とAICDとの相互作用を各種アッセイ法で確認し、その相互作用による安定化がp53の転写因子活性や細胞増殖抑制能および細胞死誘導能などのp53特有の活性を高めて、神経細胞死を誘導することを見出して、本発明を完成した。

【0010】

すなわち、本発明はAICDとp53との相互作用における阻害剤を提供する。

【0011】

前記阻害剤は、AICDとp53と結合におけるアンタゴニストであることが好ましい。

【0012】

また、特定の阻害剤がc-Ablまたはp19^{ARF}であることが好ましい。

【0013】

さらに、本発明は、薬剤がAICDとp53との相互作用における阻害剤であるか否かを決定することを特徴とする、アルツハイマー病の治療・予防において有用な薬剤をスクリーニングする方法を提供する。

【発明の効果】

【0014】

本発明に従えば、アミロイド仮説以外に、アルツハイマー病における神経細胞死のメカニズムが明らかにされ、このメカニズム中の作用点で干渉する薬剤の開発が可能となった。このような薬剤およびそのスクリーニング方法は、アルツハイマー病の治療・予防に新たな可能性を提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

以下、本発明について、好適な実施の形態を参照して、詳細に説明する。

【0016】

癌サプレッサー蛋白であるp53は、様々な細胞プロセスに関与して、細胞周期の制御、DNA修復、細胞分化、細胞老化、血管新生および細胞死（アポトーシス）を引き起こす。p53は、転写因子であり、その転写調節活性が前記の多様なプロセスでの生化学的作用を説明している。

【0017】

このような核内の転写因子である、p53が神経細胞死に関係しているとする報告もある。そこで、本発明者らは、アルツハイマー病の病因になり得る分子生物学的メカニズムの1つに、AICDがp53となんらかの相互作用を起こし、その結果、神経細胞が細胞死を受けやすくなり、ひいてはアルツハイマー病の一因となるという仮説を考えた。図1は、従来のアミロイド仮説および本発明に係るAICDとp53との相互作用を対比して示した模式説明図である。

【0018】

本発明者らの考える仮説に基づいて、p53の転写因子活性、細胞死誘導能（アポトーシス活性）などの種々のアッセイ試験をβ-APPおよび／またはAICDの存在下で行い、それらの間の相互作用について、検討した。以下、試験結果について、考察をくわえてゆく。

【0019】

p53の転写因子活性に対するβ-APPの影響(I)

p53を発現しているU2OS細胞にさらにp53遺伝子を導入するとp53に反応するプロモーター(p21、MDM2、Bax)活性が上がるということが知られている。そこでp53の代わりにβ-APPをコードする遺伝子を導入するとこれらのプロモーター類の活性が上がるか否か試験した。試験には、転写因子の機能解析の標準的な手法である、ルシフェラーゼアッセイ（ルシフェ

ラーゼリポーターアッセイ)を用いた。

【0020】

具体的には、野性型のp53を発現しているU2OS細胞に β -APPの発現ベクターおよびp53に反応するプロモーター(p21、MDM2、Bax)を持つレポーターベクターを導入する。48時間後、細胞を回収してそのルシフェラーゼ活性を測定する。このようにして得られたルシフェラーゼ活性の測定結果を各プロモーターについて、図2~4に示す。

【0021】

β -APPの強制発現によって、p21、MDM2、Bax由来のプロモーター活性がいずれも顕著に上昇したことが分かる。 β -APPは、内在性のセクレターゼによりC-60またはC-58を産生していると考えられる。さらに、U2OS細胞は野性型p53を発現している。したがって、C-60またはC-58によるp53の活性化の可能性が示唆される。

【0022】

p53の転写因子活性に対する β -APPの影響(II)

次に、p53と β -APPを併用することでp53の活性がさらに上がるのではないかと考え、試験した。試験には上記と同様にルシフェラーゼアッセイを用いた。

【0023】

具体的には、野性型のp53を発現しているU2OS細胞に β -APPの発現ベクター、p53の発現ベクターおよびp53に反応するプロモーター(p21、MDM2、Bax)を持つレポーターベクターを導入する。48時間後、細胞を回収してそのルシフェラーゼ活性を測定する。このようにして得られたルシフェラーゼ活性の測定結果を各プロモーターについて、図5~7に示す。 β -APPの強制発現によって、p21、MDM2、Bax由来のプロモーター活性がいずれもp53の強制発現とともに、顕著に β -APPの濃度依存的に上昇したことが分かる。したがって、上記と同様に、C-60またはC-58によるp53の活性化の可能性が示唆される。

【0024】

そこで、ネガティブコントロールとして、p53を発現しない細胞を用いて、同様の試験を繰り返した。

【0025】

野性型p53を欠くH1299細胞に β -APPの発現ベクターおよびp53に反応するプロモーター(p21、MDM2、Bax)を持つレポーターベクターを導入する。48時間後、細胞を回収してそのルシフェラーゼ活性を測定する。このようにして得られたルシフェラーゼ活性の測定結果を各プロモーターについて、図8~10に示す。

【0026】

β -APPの強制発現によって、p21、MDM2、Bax由来のプロモーター活性が上昇しなかったことが分かる。H1299細胞は野性型p53を欠くことから、前記U2OS細胞で観察された β -APPによるp21、MDM2、Baxプロモーターの活性化は β -APPによるp53の活性化に起因する可能性が示唆される。

【0027】

p53の細胞増殖抑制能、細胞死誘導能

上記試験で用いる、U2OS細胞でp53が本来の細胞増殖抑制能および細胞死誘導能を呈するか否かを試験した。

【0028】

野性型のp53を発現しているU2OS細胞に、p53の発現ベクターを導入した後、細胞をG418存在下で培養する。2週間後、G418抵抗性のコロニー数を測定する。得られた結果を図11に示す。

【0029】

p53の強制発現によって、G418抵抗性のコロニー数が顕著に減少したことがわかる。したがって、U2OS細胞では、p53依存性の細胞増殖抑制あるいは細胞死が起こっている。

【0030】

p53の細胞増殖抑制能、細胞死誘導能に対する β -APPの影響

次に β -APPを導入することで内在性p53の細胞増殖抑制能および細胞死誘導能に変化が

あるか否かを試験した。試験には、上記と同様にコロニー形成手法を使用した。

【0031】

野性型のp53を発現しているU20S細胞に、 β -APPの発現ベクターを導入した後、細胞をG418存在下で培養する。2週間後、G418抵抗性のコロニー数を測定する。得られた結果を図12に示す。

【0032】

β -APPの強制発現によって、G418抵抗性のコロニー数が減少したことが分かる。したがって、U20S細胞では β -APP依存性の細胞増殖抑制あるいは細胞死が起こっている。

【0033】

ネガティブコントロールとして、野性型p53を発現しないH1299細胞で同様の試験を繰り返した。すなわち、野性型p53を欠くH1299細胞に β -APPの発現ベクターを導入した後、細胞をG418存在下で培養する。2週間後、G418抵抗性のコロニー数を測定する。得られた結果を図13に示す。

【0034】

β -APPの強制発現によって、G418抵抗性のコロニー数が減少しなかったことが分かる。したがって、前記で観察された β -APP依存性の細胞増殖抑制あるいは細胞死誘導には野性型p53の存在が必要であると考えられる。

【0035】

シスプラチンによる細胞死誘導

腫瘍細胞をDNA阻害性の薬剤であるシスプラチンで処理すると、腫瘍細胞は用量依存的に細胞死を起こすことが認められている。この際、p53が関与していることも分かっている。このように内在性p53を誘導するのが知られているシスプラチンを用いて β -APPとp53の細胞死誘導の関連を調べた。そのため、まずシスプラチンによる細胞死の誘導確認試験を行った。

【0036】

神経芽腫由来の細胞株である、SH-SY5Y細胞を腫瘍細胞として使用する。

【0037】

SH-SY5Y細胞をシスプラチンで処理した後、細胞の生存率をMTT法で測定する。得られた結果を図14に示す。

【0038】

シスプラチン処理によってSH-SY5Y細胞が用量依存的に減少したことが分かる。SH-SY5Y細胞が細胞死を起こすことが確認される。

【0039】

同様の試験を繰り返し、得られた細胞産物を免疫プロットおよび免疫沈降法により分析した。すなわち、SH-SY5Y細胞をシスプラチンで処理した後、p53、p21、 β -APP、actinの発現量を免疫プロットで分析した。さらに、p53と β -APP由来の産物との相互作用を免疫沈降法で解析した。得られた結果を図15に示す。

【0040】

シスプラチン処理による内在性のp53の発現誘導が検出された。これは、図15の上から2段目のプロット図から明らかなように、抗p53抗体で免疫プロットされている。また、シスプラチン処理した際に発現したp53は、その下流のp21の発現を促進したので活性型であることが証明された。これは、図15の上から3段目のプロット図から明らかなように、抗p21抗体で免疫プロットされている。さらに、抗 β -APP抗体で細胞溶解液（破碎液）を免疫沈降させ、抗p53抗体を用いて免疫プロットを行った結果、シスプラチン処理群にはp53が存在していることが分かった（図15の一番上のプロット図）。これにより、p53と β -APP由来の産物との物理的な結合が確認された。 β -APPは膜上に存在し、p53は核内に存在するため、物理的に両者が結合することは考えられない。したがって、これは β -APPの分解産物であるC-60またはC-58が核内へ移行し、p53と結合していることを示唆している。シスプラチン処理によるSH-SY5Y細胞の細胞死誘導は、内在性p53の安定化に伴う活性化によるものであり、その際に β -APP由来の産物とp53との相互作用の機能的関与が示唆される

【0041】

 β -APP由来の産物C-60の核局在化

C-60をコードする遺伝子を人工的に作らせてその発現および核局在化の確認試験を行った。C-60は非常に不安定な性質であることが知られているので、そのC末端側にFLAGエピトープを付加する。

【0042】

U2OS細胞にFLAG標識したC-60を強制発現させた後、細胞の核および細胞質分画を調製しC-60の発現を免疫プロットによって調べる。得られた結果を図16に示す。

【0043】

核マトリックス蛋白であるLaminB(核のマーカー)および細胞質分画に存在するraS(細胞質マーカー)はいずれも所定の分画に存在し、分画はうまくいっている。この条件下でC-60は確かに核分画中に局在したことが分かる。また、FLAG抗体を用いて、免疫染色法で、C-60の存在を生化学的に観察した結果、核マーカーであるDAPIと重なることが分かる。得られた顕微鏡での観察結果を図17に示す。したがって、C-60の核局在化が確認された。

【0044】

 β -APP由来の産物C-58またはC-60とp53との相互作用

既に、上記で β -APPとp53の結合が示唆されたが、C-58および/またはC-60との結合可否かを試験した。

【0045】

COS7細胞にFLAG標識したC-58またはC-60を強制発現させた後、p53との相互作用の有無を免疫沈降法で検討した。得られた結果を図18に示す。

【0046】

抗p53抗体での免疫沈降物は、抗FLAG抗体で免疫プロットされた(図18の一番上のプロット図)。したがって、C-58およびC-60とp53との結合が検出されたことになる。 β -APPによるp53の活性化は β -APP由来の産物C-58およびC-60とp53との物理的結合を介した現象であることが示唆される。

【0047】

アルツハイマー病のメカニズムは β -APPの分解産物である β -42または β -40が細胞膜に沈着して、神経細胞死の結果生じるとというのがこれまでの定説であった。しかしながら、前述の結果をまとめると、さらにC末端側に産生するC-60またはC-58が核内に移行し、核内のp53と物理的に結合してp53の安定化を高め、転写因子活性や細胞増殖抑制能および細胞死誘導能などのp53特有の活性を高め神経細胞死を誘導することが新たに分かった。このようにアルツハイマー病のメカニズムの1つにC-60またはC-58とp53の物理的結合が関与していることが示唆される。

【0048】

したがって、本発明は、アルツハイマー病の治療薬としてAICD(C-60および/またはC-58)とp53との核内での相互作用に干渉するような薬剤の可能性を提供する。C-60またはC-58が核内に移行しなければ、核内にしか存在しないp53と結合しない。そこで、1つのアプローチとして、この核内移行を阻害する薬剤の発見、開発が考えられる。また、別のアプローチとして、AICDを分解する薬剤の発見、開発が考えられる。さらに、AICD(C-60またはC-58)とp53との相互作用を阻害する薬剤の発見、開発が考えられる。なお、 β -APPからAICDを産生する酵素である β 、 γ セクレターゼの阻害剤の開発は既に進められている(富田ら、前掲)。ここでいう候補薬剤とは、核酸、タンパク質、低分子化合物(化学合成または天然由来)、タンパク質以外的高分子化合物などである。

【0049】

本発明によれば、特にAICDとp53との相互作用における阻害剤の開発が提供される。

【0050】

このような阻害剤のスクリーニング方法としては、Two-Hybrid System(例えば、Gyuris, J. Cell, 1993, 75, 791-803; Golemis, E. A., Current Protocols in Molecular Bio

logy (John Wiley & Sons, Inc.) 1996, Ch. 20.0-20.1)が挙げられる。また、免疫学的手法で、阻害剤のスクリーニング法を実施することもできる。これは、本発明ではより好ましい。具体的には、細胞（神経細胞）内でAICD分子とp53分子を発現させ、一定時間候補薬剤と共に培養した後、細胞を粉砕して細胞溶解液を調製する。一方の分子に対する抗体で免疫沈降させ、沈殿中に含まれる他方の分子を免疫学的手法（免疫プロット等）で検出ないし、定量することで、候補薬剤の両分子の相互作用に及ぼす影響を検出できる。ここで、上記培養系に適当なアゴニストと候補薬剤とを同時に添加して、上記アッセイを行い、候補薬剤を含まない細胞からの免疫沈降物と比較することで阻害剤のスクリーニングが可能である。

【0051】

候補薬剤として可能性のある既知の蛋白としては、c-Ablおよびp19^{ARF}が挙げられる。これらの蛋白は、Mdm2がp53に結合するのを拮抗的に阻害することが知られている（R. V. Sionov et al., Oncogene 18, 6145-6157, (1999)）。

【0052】

上記のスクリーニング方法で同定されたAICDとp53との相互作用における阻害剤であるタンパク質は、アルツハイマー病を患う患者またはその前記症状としての痴呆症状を示す患者に経口的に、または非経口的に投与する。この目的で、そのタンパク質を薬学的組成物として調製する。これは、有効量の該結合阻害を薬学的に許容される担体、もしくは希釈剤と混合して、適当な剤形とする。投与に適した剤形は、錠剤、丸剤、散剤、液剤、懸濁剤、乳剤、カプセル剤、坐剤、注射剤等である。

【実施例】

【0053】

以下、実施例を挙げて、本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0054】

（細胞培養およびトランスフェクション）

COS7およびヒト骨肉種U2OS細胞を10%熱不活性化ウシ胎児血清（FBS、Life Technologies, Inc.）とペニシリン（100IU/ml）／ストレプトマイシン（100 μ g/ml）を添加したダルベッコ変法イーグル培地（Dulbecco's modified Eagle medium: DMEM）に維持した。H1299ヒト肺大細胞癌細胞およびSH-SY5Yヒト神経芽細胞は、10%熱不活性化FBSとペニシリン（100IU/ml）／ストレプトマイシン（100 μ g/ml）を添加したRPMI 1640培地に維持した。細胞は、空气中水飽和5%炭酸ガス雰囲気下、37℃で培養した。一過的トランスフェクションのためには、製造者の指示書に従い、FuGENE6トランスフェクション試薬（Roche Molecular Biochemicals社製）を用いて各発現プラスミドまたは所定の組み合わせでトランスフェクトした。U2OSとH1299細胞の一過的トランスフェクションのためには、製造者の指示書に従い、リポフェクトアミン（LipofectAMINE、Life Technologies, Inc.社製）を用いて実施した。

【0055】

（ルシフェラーゼアッセイ）

ルシフェラーゼアッセイでは、U2OS細胞を12ウエルのプレート上で増殖した（ 5×10^4 細胞／ウエル）、そしてp53とp21^{WAF1}、MDM2またはBaxプロモーターを含むp53反応性ルシフェラーゼレポーター構築体の発現プラスミドの一定量さらに、必要な場合 β -APPの発現プラスミドの漸増量を用いて、細胞を一過的にトランスフェクトした。トランスフェクション当たりプラスミドDNAの全量をpcDNA3（Invitrogen社製）で一定量（510 ng）に保った。トランスフェクションの48時間後、トランスフェクトされた細胞を回収し、氷冷1xPBSで洗浄した。ルシフェラーゼ活性は、二重ルシフェラーゼレポーターアッセイ系（Promega社製）を用いて、製造者の指示書に従って、測定した。

【0056】

（コロニー形成アッセイ）

U2OS細胞は、p53をコードする発現プラスミドの漸増量の存在下、または存在なしにト

ランスフェクトした。トランスフェクション48時間後、G418を含む培地中(400 μ g/mlの最終濃度)に細胞を維持した。2週間選択の後、プレートをギムザ染色液(Giemsa)で染色した。薬剤耐性コロニーの数をスコアした。

【0057】

(細胞生存アッセイ)

細胞生存率を3-(4,5-ジメチルチアゾリル-2-イル)2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド(MTT)アッセイ変法で決定した。すなわち、U2OS細胞を96ウエルマイクロタイタープレート(5X10³細胞/ウエル)中に100 μ lの完全培地で植菌し、付着するようにした。翌日、培地を変え、細胞をシスプラスチンで24時間、処理した。MTTアッセイでは、10 μ lのMTT溶液を各ウエルに添加して、37℃で3時間インキュベートした。各ウエルの吸光度の記録をマイクロプレートリーダー(450型、Bio-Rad Laboratories社製)を用いて570 nmで実行した。

【0058】

(免疫沈降および免疫プロット)

免疫沈降の実験では、COS7細胞を適当なプラスミドで一過的にトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、細胞を氷冷リン酸緩衝食塩水(PBS)、氷冷EBC細胞溶解緩衝液[50 mM Tris-Cl pH 7.5 120 mM NaCl 0.5% (v/v) Nonidet P-40および1mMフェニルメチルスルホニルフロリド(PMSF)]中に溶解して、全細胞溶解物は抗p53モノクローナル抗体(DO-1 Oncogene Research Products社製)を用いて、免疫沈降させた。免疫沈降物を抗FLAGモノクローナル抗体(M2 Sigma Chemical社製)を用いて、免疫プロットして、解析した。タンパク質シグナルは、製造者の指示書に従い、増強化学発光によって可視化した(ECL Amersham Pharmacia Biotech社製)。

【0059】

(細胞下分画)

細胞を細胞質分画および核分画に分けた。すなわち、トランスフェクトした細胞を氷冷1XPBSで2回洗浄した。10 mM Tris-HCl, pH7.5、1 mM EDTA、0.5% NP-40およびプロテアーゼ阻害剤ミックス(Sigma Chemical社製)を含む細胞溶解緩衝液中で、4℃30分間、細胞溶解した。細胞溶解物を15000rpmで、10分間遠心分離して、可溶分画を細胞質抽出物として回収した。不溶物質を細胞溶解緩衝液で洗浄して、そしてさらに1XSDSサンプルバッファに溶解して、核分画を回収した。核分画および細胞質分画を抗FLAG抗体、抗ラミンBモノクローナル抗体(Ab-1 Oncogene Research Products社製)または抗rasモノクローナル抗体(RASK-3 生化学工業社製)を用いる免疫分析に供した。

【0060】

(免疫染色)

U2OS細胞をFLAGで標識したC60をコードする発現プラスミドで一過的にトランスフェクトした。ガラスカバースリップ上で増殖した細胞を1xPBS中、室温で30分間、3.7%ホルムアルデヒドで固定化し、室温で5分間、0.2% Triton X-100を用いて透過性を上げた。3%ウシ血清アルブミンを含む1xPBS中、1時間ブロックした。1xPBSで洗浄した後、細胞を室温で1時間、抗FLAGモノクローナル抗体とともにインキュベートした。一次抗体とともにインキュベーション後、細胞を洗浄し、ローダミン共役二次抗体(Invitrogen社製)とともに、室温で1時間インキュベートした。細胞核をDAPIで染色した。細胞を最終的に1xPBSで洗浄し、カバースリップを皿から取り除き、スライド上に載せて、Fluoview共焦点レーザ走査顕微鏡(Olympus社製)で観察した。

【産業上の利用可能性】

【0061】

以上説明したように、本発明は、抗アミロイド抗体、 β , γ セクレターゼ阻害等以外の全く新しい、作用機序に基づくアルツハイマー病の治療・予防に有用な薬剤の開発を可能にする。

【図面の簡単な説明】

【0062】

【図 1】 アミロイド仮説ならびに本発明に係るAICDとp53との相互作用を説明する模式図

【図 2】 p53発現細胞で β -APPを強制発現させたときのp21プロモーターの発現能をルシフェラーゼアッセイで測定した結果を示すグラフ

【図 3】 p53発現細胞で β -APPを強制発現させたときのMDM2プロモーターの発現能をルシフェラーゼアッセイで測定した結果を示すグラフ

【図 4】 p53発現細胞で β -APPを強制発現させたときのBaxプロモーターの発現能をルシフェラーゼアッセイで測定した結果を示すグラフ

【図 5】 p53発現細胞で β -APPおよびp53を強制発現させたときのp21プロモーターの発現能をルシフェラーゼアッセイで測定した結果を示すグラフ

【図 6】 p53発現細胞で β -APPおよびp53を強制発現させたときのMDM2プロモーターの発現能をルシフェラーゼアッセイで測定した結果を示すグラフ

【図 7】 p53発現細胞で β -APPおよびp53を強制発現させたときのBaxプロモーターの発現能をルシフェラーゼアッセイで測定した結果を示すグラフ

【図 8】 p53非発現細胞で β -APPを強制発現させたときのp21プロモーターの発現能をルシフェラーゼアッセイで測定した結果を示すグラフ

【図 9】 p53非発現細胞で β -APPを強制発現させたときのMDM2プロモーターの発現能をルシフェラーゼアッセイで測定した結果を示すグラフ

【図 10】 p53非発現細胞で β -APPを強制発現させたときのBax2プロモーターの発現能をルシフェラーゼアッセイで測定した結果を示すグラフ

【図 11】 p53の細胞増殖抑制能および細胞死誘導能をコロニー形成アッセイで測定した結果を示すグラフ

【図 12】 p53発現細胞で β -APPを強制発現させたときのp53の細胞増殖抑制能および細胞死誘導能をコロニー形成アッセイで測定した結果を示すグラフ

【図 13】 p53非発現細胞で β -APPを強制発現させたとき薬剤耐性コロニー数をコロニー形成アッセイで測定した結果を示すグラフ

【図 14】 シスプラチン誘導性の用量依存的SH-SY5Y細胞の細胞死を示すグラフ

【図 15】 SH-SY5Y細胞のシスプラチン処理物の免疫プロット図である。 図中、「IP」は免疫沈降を、「IB」は免疫プロットを指す。

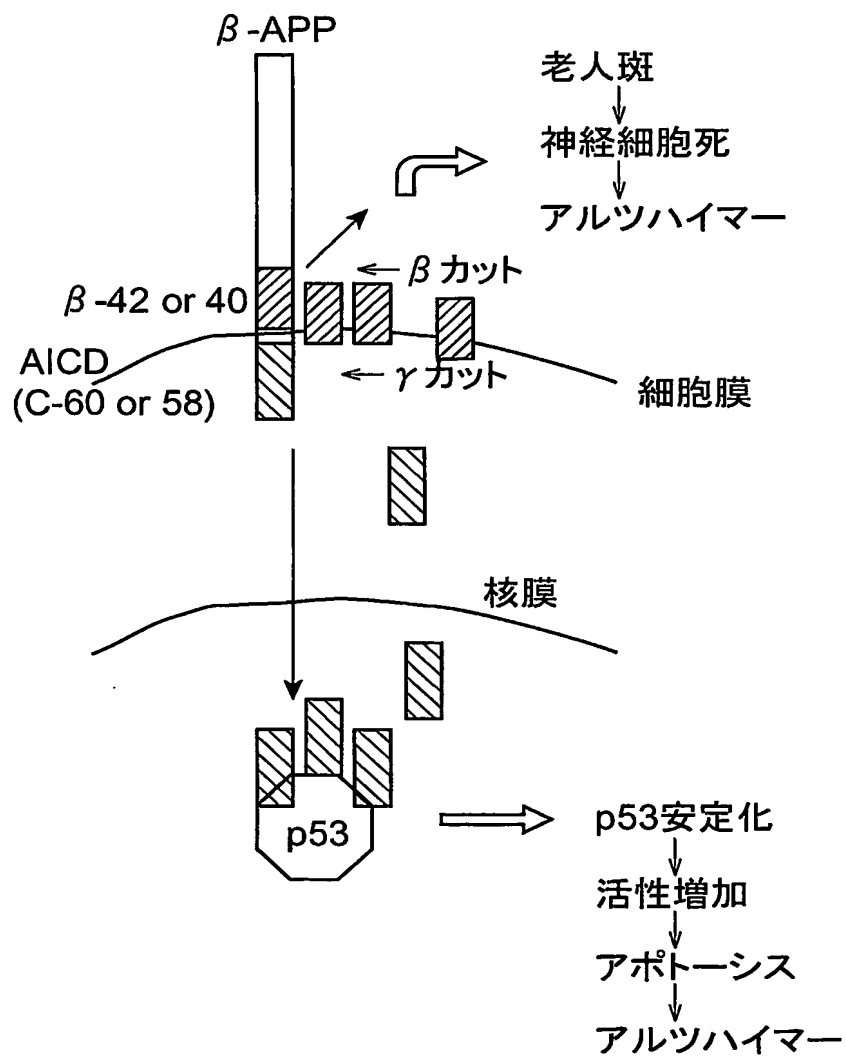
【図 16】 U2OS細胞にC-60を強制発現させた産物を核分画と細胞質分画に分離し、それぞれの免疫プロット図である。 図中、「C」は細胞質分画を、「N」核分画を指す。

【図 17】 U2OS細胞にC-60を強制発現させた産物を抗FLAG抗体を用いて、免疫染色したものを共焦点走査顕微鏡で観察した写真図

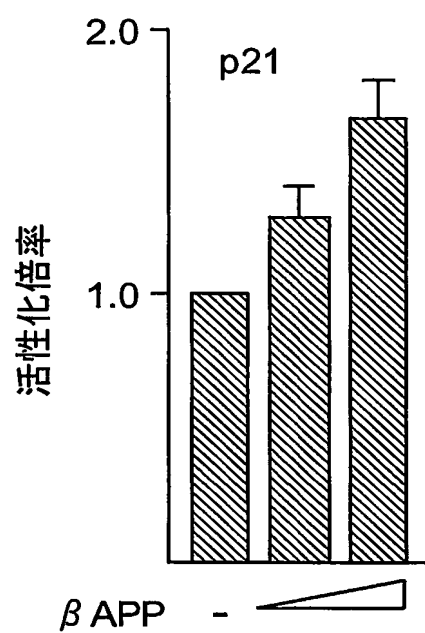
【図 18】 COS7細胞にC-58またはC-60を強制発現させた産物の免疫プロット図である。 図中、「IP」は免疫沈降を、「IB」は免疫プロットを指す。

【書類名】図面
【図 1】

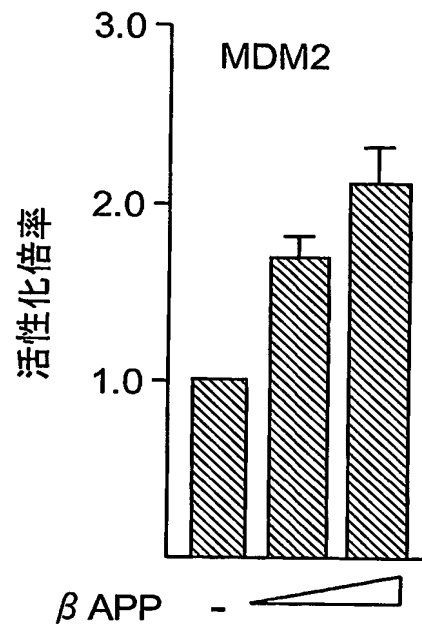
AICD



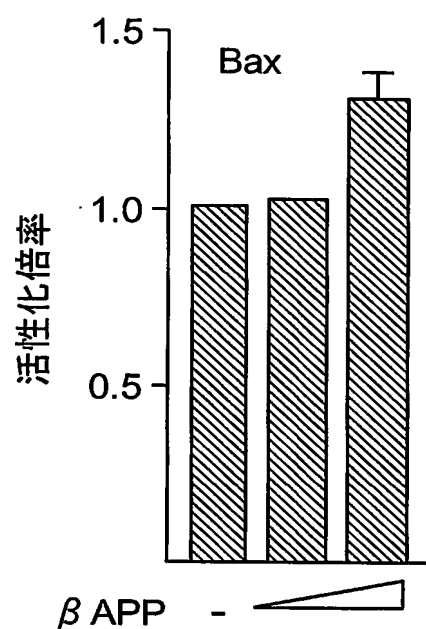
【図 2】



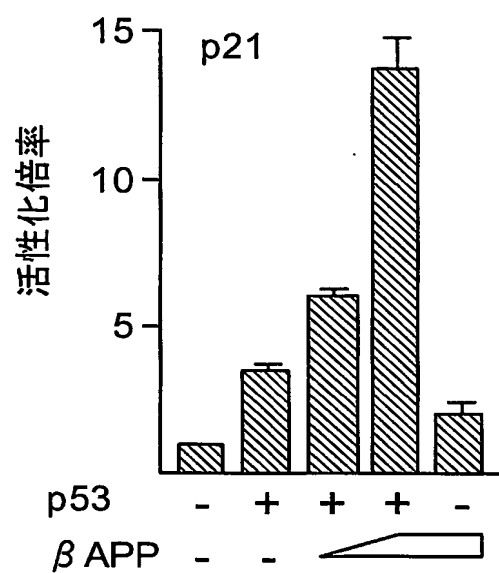
【図 3】



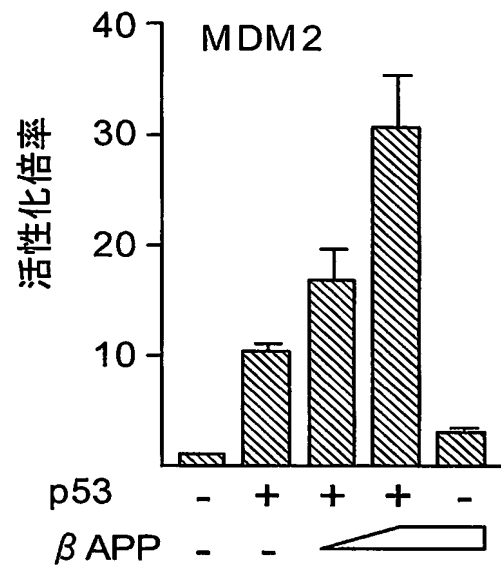
【図 4】



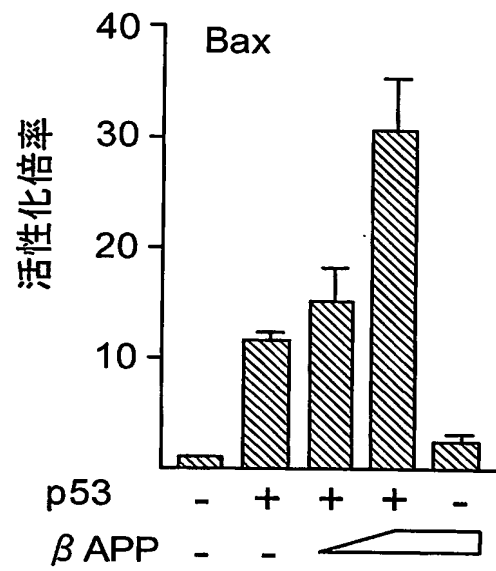
【図 5】



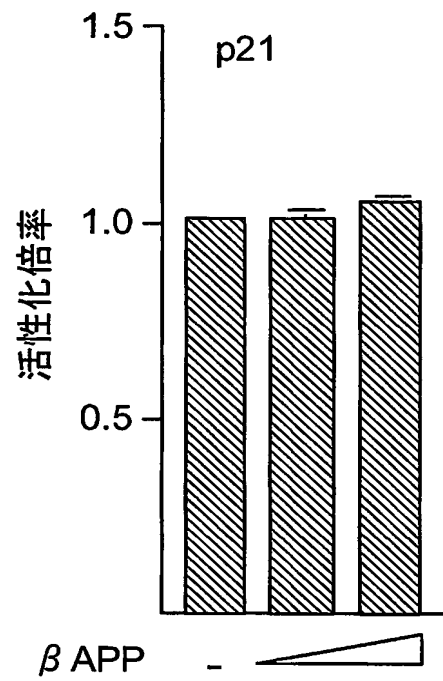
【図 6】



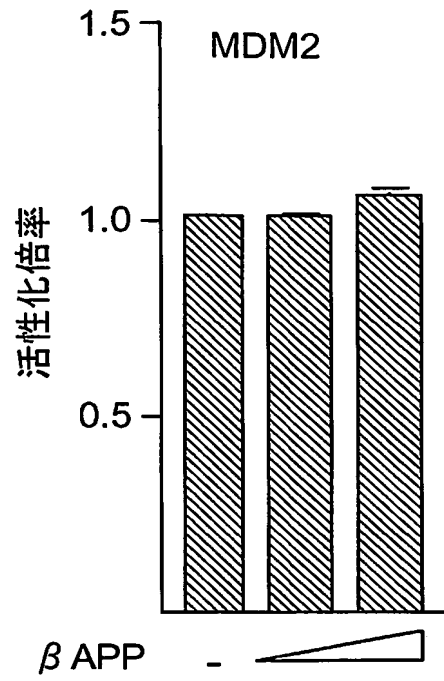
【図 7】



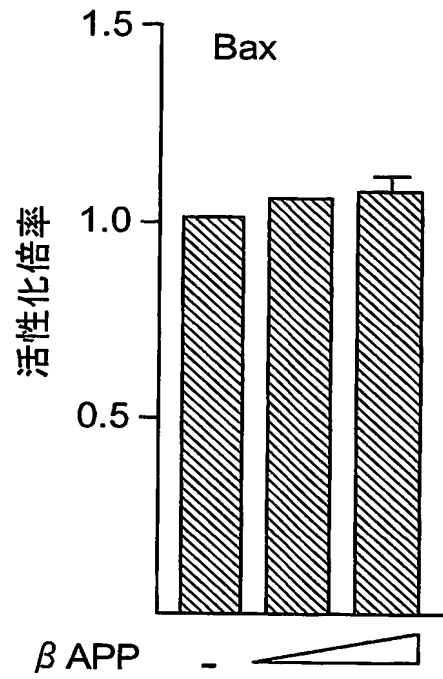
【図 8】



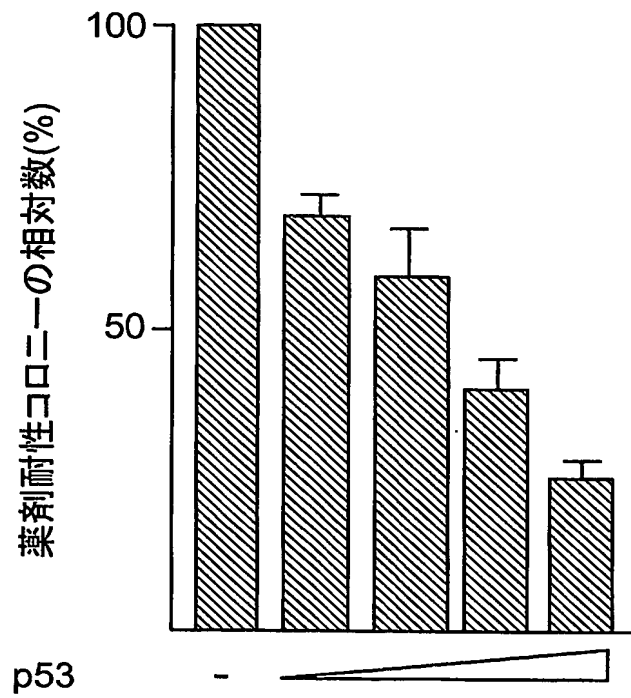
【図 9】



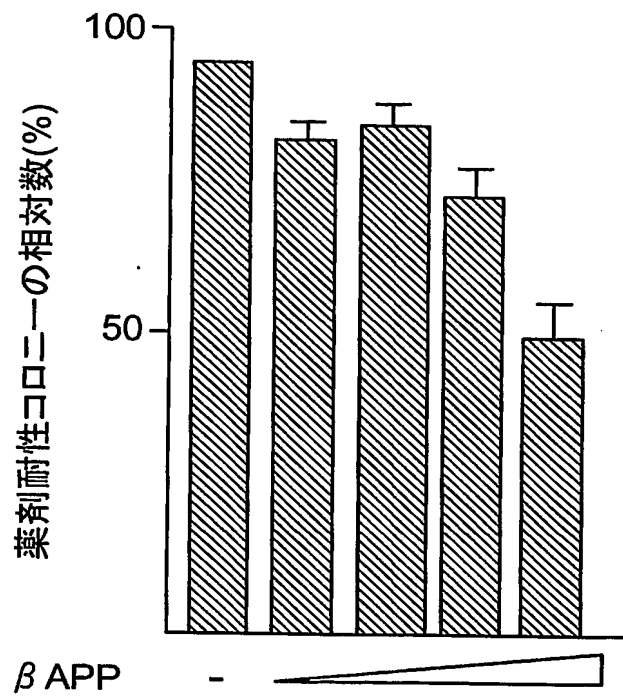
【図 10】



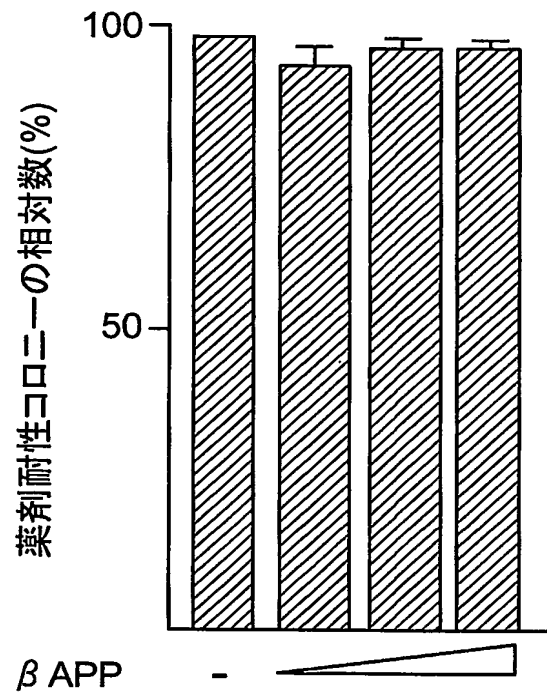
【図 11】



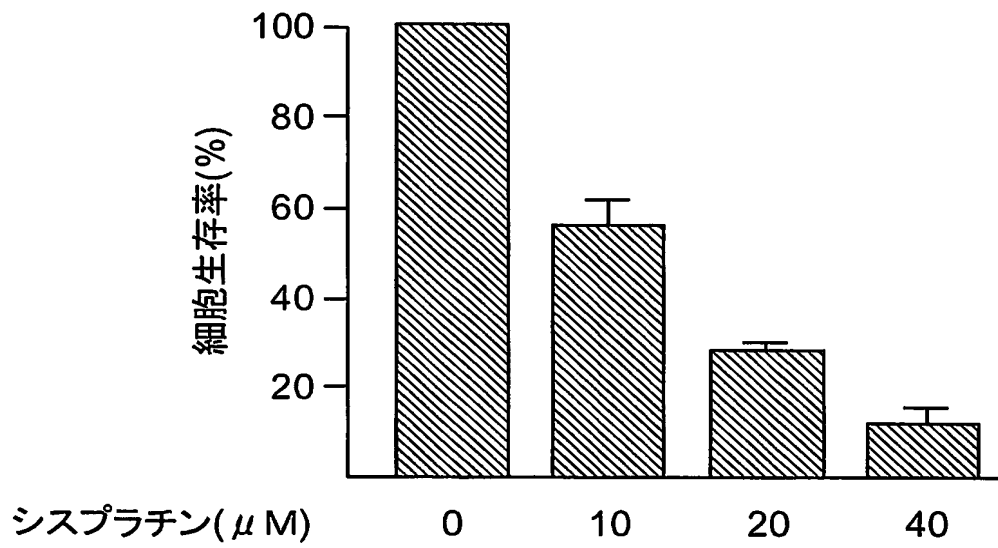
【図 12】



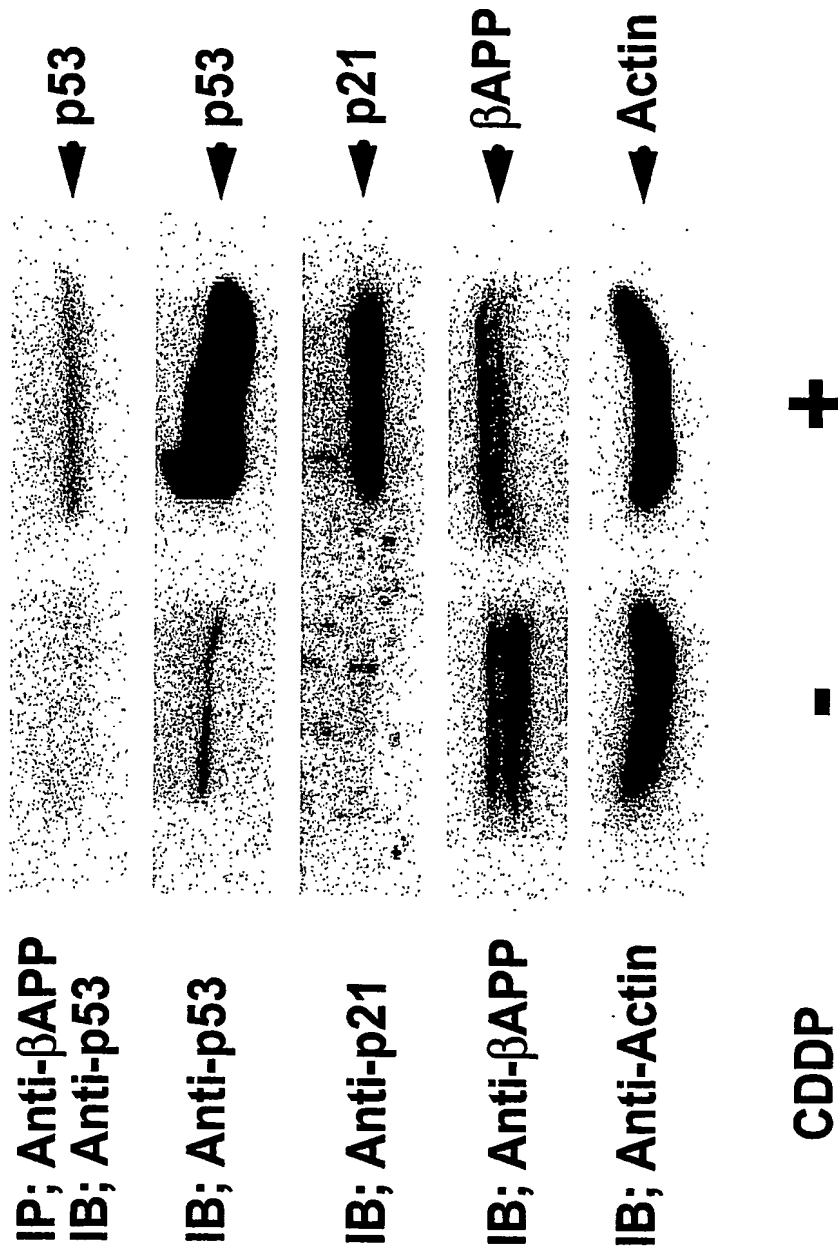
【図 13】



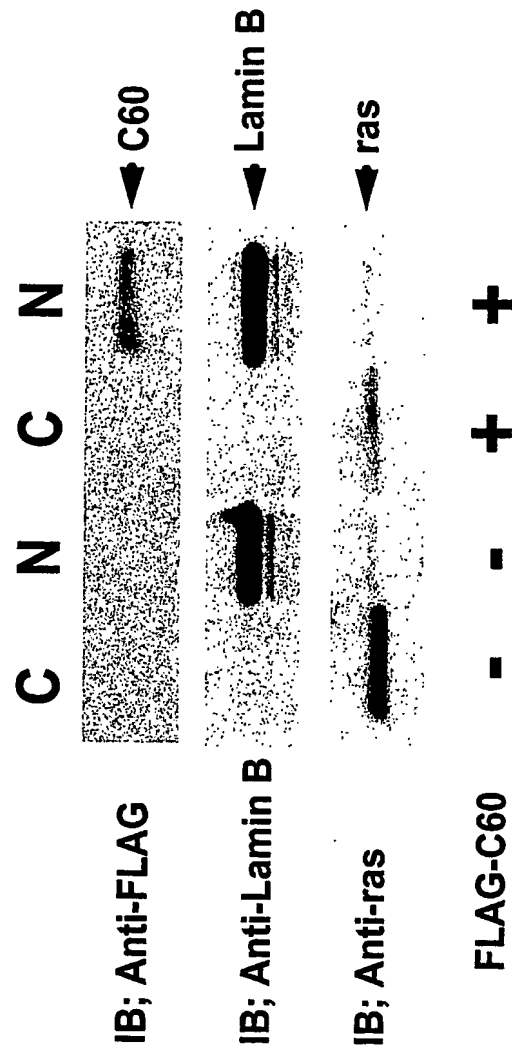
【図 14】



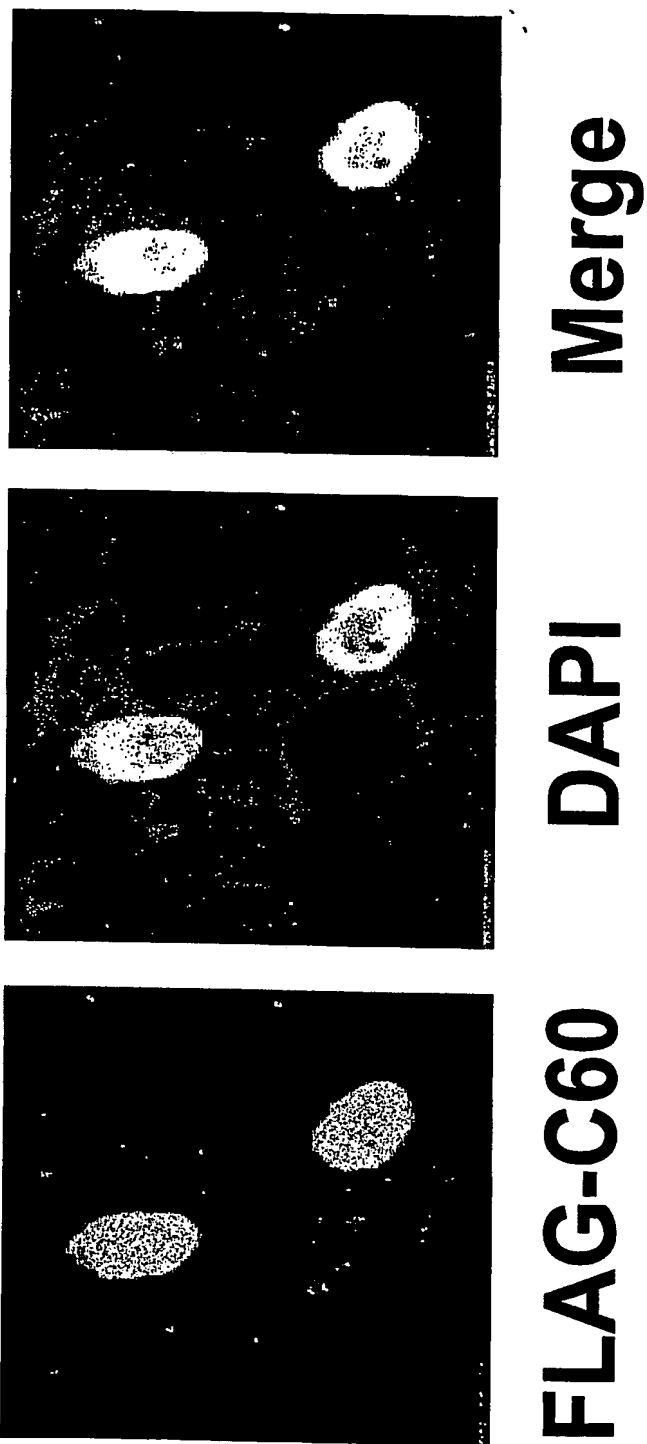
【図 15】



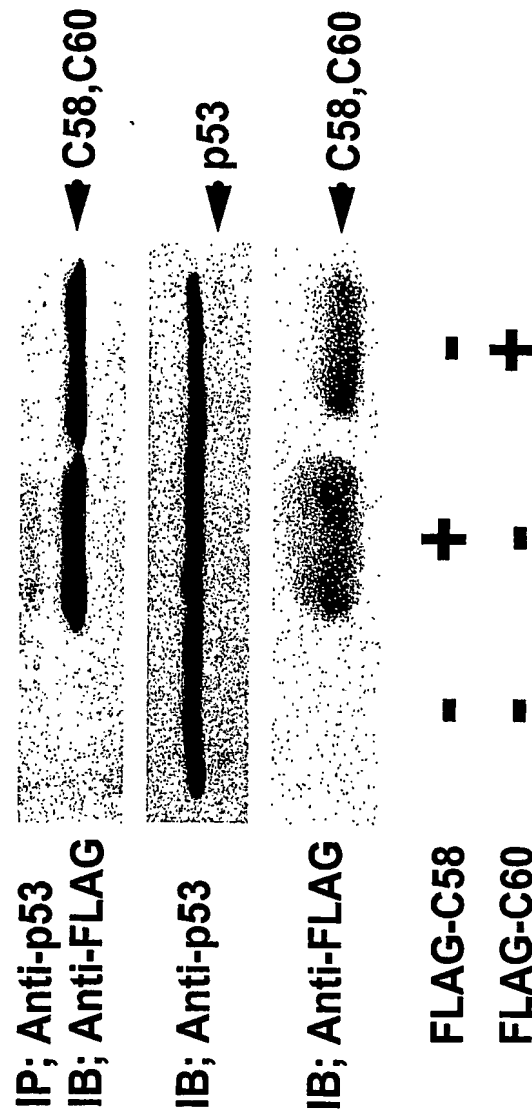
【図 16】



【図 17】



【図 18】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 アミロイド仮説に基づかない、新しい作用機序のアルツハイマー病の治療・予防剤を提供する。

【解決手段】 AICDとp53との相互作用における阻害剤をスクリーニングする。

【選択図】 なし

【書類名】 出願人名義変更届
【提出日】 平成16年 7月14日
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2003-314345
【承継人】
【住所又は居所】 千葉県千葉市中央区市場町 1 番 1 号
【氏名又は名称】 千葉県
【承継人代理人】
【識別番号】 100088155
【弁理士】
【氏名又は名称】 長谷川 芳樹
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 014708
【納付金額】 4,200円

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-314345
受付番号	50401193250
書類名	出願人名義変更届
担当官	楠本 眞 2169
作成日	平成 16 年 10 月 5 日

<認定情報・付加情報>

【承継人】

【識別番号】	591014710
【住所又は居所】	千葉県千葉市中央区市場町 1 番 1 号
【氏名又は名称】	千葉県
【承継人代理人】	申請人
【識別番号】	100088155
【住所又は居所】	東京都中央区銀座一丁目 10 番 6 号 銀座ファーストビル 創英国際特許法律事務所
【氏名又は名称】	長谷川 芳樹

特願 2 0 0 3 - 3 1 4 3 4 5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 1 6 0 5 2 2]

1. 変更年月日 1 9 9 0 年 9 月 1 3 日

[変更理由] 新規登録

住 所 佐賀県鳥栖市田代大官町 4 0 8 番地

氏 名 久光製薬株式会社

特願 2 0 0 3 - 3 1 4 3 4 5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 9 1 0 1 4 7 1 0]

1. 変更年月日

1 9 9 2 年 9 月 4 日

[変更理由]

住所変更

住 所

千葉県千葉市中央区市場町 1 番 1 号

氏 名

千葉県